动 物 学 研 究 2001, Aug. 22 (4): 265～269 CN 53－1040/Q ISSN 0254－5853
Zoological Research

上海四膜虫和两株嗜热四膜虫的 rRNA 基因 ITS－1 序列及分子系统关系

缪 炜 余育和 沈韫芬①
（中国科学院水生生物研究所 武汉 430072）

摘要：测定并比较了自接型的上海四膜虫（*Tetrahymena shanghaienisis*）和两株接合型的嗜热四膜虫（*T. thermophila* Ⅱ和 *T. thermophila* Ⅵ）的 ITS－1 序列，以多态喇叭虫（*Stentor polymorphrus*）为外来群，利用最大简约法和邻接法构建了它们的系统发育树。分析指出：三者中，*T. shanghaienisis* 较早地从祖先种中分化出来；自接型可能是一种较接合型原始的生殖方式。

关键词：四膜虫；系统发育；ITS－1；自配型；接合型
中图分类号：Q959.116，Q951⁺.3 **文献标识码**：A **文章编号**：0254－5853(2001)04－0265－05

四膜虫（*Tetrahymena*）是一种单细胞真核生物，属于纤毛门（Ciliophora）寡膜纲（Oligohymenophorea）的膜口目（Hymenostomatida），体纤毛均匀分布，口器为典型的"四膜结构"（左缘有 3 片小膜，右缘有 1 片波动膜）。它是研究核酶，细胞凋亡及生物进化等方面的良好模式生物，有着重要的分子生物学研究前景（Cech, 1986; 李荫蓁等，1996; Bernhard & Schlegel, 1998）。在四膜虫接合生殖方式中存在着自接型（slefer）和接合型（mating type）两种方式。接合型四膜虫必须通过有性生殖过程才能传代；而自接型四膜虫不通过有性生殖过程也能产生健康后代（冯荪莲等，1988；陈阅增等，1982），而且野生的自接型四膜虫在自然界普遍存在。因而对自接型的存在意义以及与接合型间的系统进化关系进行研究是十分有意义的。

转录间隔区 1（first internal transcribed spacer, ITS－1）是 rRNA 基因中位于 18*S* 和 5.8*S* rRNA 间的中度保守序列，被认为是研究包括原生动物在内的多种生物种内和种间系统发育关系的理想的分子标记（Pleyte *et al*., 1992; Schlotterer *et al*., 1994; Benjamin & Robert, 1997），但尚未见到将其用于四膜虫间系统发育研究的相关报道。本文在测得自接型的上海四膜虫（*T. shanghaienisis*）和两株接合型的嗜热四膜虫（*T. thermophila* Ⅱ和 *T. thermophila* Ⅵ）的 rRNA ITS－1 序列的基础上，分析了三者的系统发育关系，并针对四膜虫的自接型和接合型两种生殖方式的进化问题进行了重点讨论。

1 材料与方法

1.1 样品采集

上海四膜虫（*T. shanghaienisis*）和两株嗜热四膜虫（*T. thermophila* Ⅱ和 *T. thermophila* Ⅵ）均为北京大学生命科学学院惠赠，培养方法参见陈阅增等（1982）。作为外来群的多态喇叭虫（*Stentor polymorphrus*）采自武汉东湖，样品分离方法参见张锡元等（2000）。

1.2 总 DNA 提取

参见张锡元等（2000）。DNA 溶于超纯水中，－20℃保存备用。

1.3 ITS－1 片段的 PCR 扩增及序列分析

PCR 扩增所用引物为：forward primer: －5' GTT CCC CTT GAA CGA GGA ATT C 3'；reverse primer: －5' CGC ATT TCG CTG CGT TCT TC 3'（Benjamin & Robert, 1997），它们分别对应于 18*S* rDNA 的 5'端

收稿日期：2001－01－16；修改稿收到日期：2001－03－12
基金项目：国家自然科学基金资助项目（39730070）
①通讯联系人，（027）87647679、87646885；shen@public.wh.hb.cn

和5.8*S* rDNA的3'保守序列。PCR反应体积为25 μL,反应条件为94℃ 1 min,50℃ 0.5 min,72℃ 1.5 min,共35个循环。反应前94℃预变性10 min,反应后72℃延伸10 min。PCR产物用Glassmilk(Biostar)纯化回收,连接到T-Vector(Promega)上,再转化到*Ecol*.Top10F[1]中,用于测序。测序在ABI prism377自动测序仪上完成。

ITS-1片段的DNA序列用DNAtools 1.05结合人工进行排序(alignment),用PHYLIP3.5 c中的DNApars以最大简约法和Neighbor以邻接法(先以DNAdist生成遗传距离矩阵)构建系统树,系统树用100次Bootstrap重抽样统计评价各支的置信度。

2 结 果

2.1 序列分析

所扩增片段的DNA序列数据列于图1。上海四膜虫和两株嗜热四膜虫的ITS-1区,及18*S*rDNA的5'端和5.8*S*rDNA的3'端的部分序列共计约420 bp,而外来群多态喇叭虫的仅为296 bp,有着明显的差异。尤其表现在ITS-1区,上海四膜虫和两株嗜热四膜虫的ITS-1区序列分别为172、169和169 bp,而多态喇叭虫的仅为74 bp。这3种四膜虫的18*S*rDNA部分都为221 bp,只有5个位点发生碱基取代,而相互间序列的差异主要在ITS-1区,缺失和插入位点有3个,取代位点有13个,其中颠换为6个,转换为7个。彼此间的变异百分数和碱基差异数见表1。

2.2 系统发育树

用于邻接法建树的遗传距离列于表2,由邻接法和最大简约法构建的系统发育树如图2。两种方法得到的系统树的拓扑结构基本一致,且Bootstrap验证系统树各支都有很高的支持率,说明系统关系的可信度较高。

表1 上海四膜虫和两株嗜热四膜虫的遗传变异度和碱基差异数

Table 1 Nucleotide sequence divergence among *T. shanghaiensis*, two strains of *T. thermophila*

	T. shanghaiensis	*T. thermophila* Ⅱ	*T. thermophila* Ⅵ
T. shanghaiensis	—	8.721%	8.721%
T. thermophila Ⅱ	15 (6, 6, 3)	—	1.183%
T. thermophila Ⅵ	15 (6, 6, 3)	2 (2, 0, 0)	—

对角线上为遗传变异度百分比;对角线下为碱基差异数、括号中分别为转换、颠换和缺失碱基数(percentage divergence is above the diagonal; the number of nucleotide differences including substitution, transversion and deletion are below the diagonal)。

表2 上海四膜虫、两株嗜热四膜虫和多态喇叭虫间的遗传距离

Table 2 Genetic distances among *T. shanghaiensis*, two strains of *T. thermophila* and outgroup *S. polymorphrus*

	T. thermophila Ⅱ	*T. thermophila* Ⅵ	*T. shanghaiensis*	*S. polymorphrus*
T. thermophila Ⅱ	0.0000	0.0024	0.0451	0.3517
T. thermophila Ⅵ	0.0024	0.0000	0.0425	0.3517
T. shanghaiensis	0.0451	0.0425	0.0000	0.3353
S. polymorphrus	0.3517	0.3517	0.3353	0.0000

3 讨 论

3.1 上海四膜虫、嗜热四膜虫Ⅱ、嗜热四膜虫Ⅵ和多态喇叭虫间的系统发育关系

上海四膜虫、嗜热四膜虫Ⅱ、嗜热四膜虫Ⅵ的形态结构完全一致,过去同属于梨型四膜虫(*T. pyriformis*)复合种(冯荪莲等,1988),因而缺乏用于系统发育研究的形态标记。Preparata *et al*.(1989)利用rDNA中转录区(5*S*、5.8*S*、28*S*和17*S*)研究了四膜虫间的系统发育关系,由于转录区进化速率较慢,影响了在复合种内运用的分辨率,而且他们的研究对象中没有自接型的四膜虫。被选作外来群的多态喇叭虫属旋毛纲(Spirotrichea),在SSrRNA和H_4基因系统树中都比四膜虫所属的寡膜纲早从纤毛虫祖先种中分化出来(Strüder-Kypke, 2000; Bernhard & Schlege, 1998),而且Johnson(1990)对天蓝喇叭虫(*Stentor coeruleus*)和四膜虫等纤毛虫的LSrRNA系统发育关系进行的研究表明,喇叭虫处在比四膜虫更原始的地位。我们利用ITS-1区序列构建的系统树中,上海四膜虫处于离外来群多态喇

```
                                 18S
T. thermophila II     GTTCCCCTTG AACGAGGAAT TCCTAGTAAG TGCAAGTCAT CAGCTTGCGT TGATTATGTC
T. thermophila VI     GTTCCCCTTG AACGAGGAAT TCCTAGTAAG TGCAAGTCAT CAGCTTGCGT TGATTATGTC
T. shanghaienisis     GTTCCCCTTG AACGAGGAAT TCCTAGTAAG TGCAAGTCAT CAGCTTGCGT TGATTATGTC
S. polymorphrus       GTTCCCCTTG AACGAGGAAT TCCTAGTAAA CGCAAGTCAT CAGCTTGCAT TGACTAGGTC
                                 18S
                      CCTGCCGTTT GTACACACCG CCCGTCGC-T TGTAGTAA-- -CGAATGGTC TGGTGAACCT
                      CCTGCCGTTT GTACACACCG CCCGTCGC-T TGTAGTAA-- -CGAATGGTC TGGTGAACCT
                      CCTGCCGTTT GTACACACCG CCCGTCGC-T TGTAGTAA-- -CGAATGGTC TGGTGAACCT
                      CCTGCCCTTT GTACACACCG CCTGTCGCTT CCTACCGATT TCGAGTGATG AGGTGAACCC
                                 18S
                      TCTGGACTGC GACAGCAATG TTGCGGAAAA ATAAGTAAAC CCTACCATTT GGAACAACAA
                      TCTGGACTGC GACAGCAATG TTGCGGAAAA ATAAGTAAAC CCTACCATTT GGAACAACAA
                      TCTGGACTGT GGCAGCAATG CTACGGAAAA ATAAGTTAAC CCTACCATTT GGAACAACAA
                      TCCGGACTGT GCGCGCAAGC GTT-GGGAAG TTGAGTAAAC CTTATCACTT AGAGGAAGGA
                                                       18S ————▶◀———— ITS-1
                      GAAGTCGTAA CAAGGTATCT GTAGGTGAAC CTGCAGATGG ATCATTAACA CAATTAACAA
                      GAAGTCGTAA CAAGGTATCT GTAGGTGAAC CTGCAGATGG ATCATTAACA CAATTAACAA
                      GAAGTCGTAA CAAGGTATCT GTAGGTGAAC CTGCAGATGG ATCATTAACA CAATTAACAA
                      GAAGTCGTAA CAAGGTATCT GTAGGTGAAC CTGCAGATGG ATCATT---- ----------
                                                          ITS-1
                      ACCTTAACTT ATGTACTTTC GAAGAGAACT TCGGTTTTCT TCGAGGTTTT ATTGTCACAC
                      ACCTTAACTT ATGTACTTTC GAAGAGAACT TCGGTTTTCT TCGAGGTTTT ATTGTCACAC
                      ACCTTAACTT ATGTACTTTT GAAGTTTATT TCGGTAAACT TCAAGGTCTT ATTGTCACAC
                      ---------- ---AAC--AC ATCC---AC- ---------- ------ATAA A---------
                                        ITS-1
                      CTAGTGTGAA T-AAAAATTT TTCATATGTC TGAGATCTGG ATAACATCCA AA--ACGAAA
                      CTAGTGTGAA T-AAAAATTT TTCATATGTC TAAGATCTGG ATAACATCCA AA--ACGAAA
                      CTAGTGTGAA TTAAAAATCC TTCATATGTC TAAGATCTGG ATAACATCCA AAAAACGAAA
                      ---------- -------CCT ATCA------ ---------- ---AAACACT A--------
                            ITS-1 ————▶◀———— 5.8S
                      -AGAAAATTT TCAACGGTGG ATATCTAGGT TCCCGTGACG ATGAAGAACG CAGNGAAATG CG
                      -AGAAAATTT TCAACGGTGG ATATCTAGGT TCCCGTGACG ATGAAGAACG CAGCGAAATG CG
                      -AGAAAATTT TCAACGGTGG ATATCTAGGT TCCCGTGACG ATGAAGAACG CAGCGAAATG CG
                      TTTTAAAACC TCAGCGATGG ATATCTCGGC TTTCGTAACG ATGAAGAACG CAGCGAAATG CG
```

图 1　上海四膜虫、两株嗜热四膜虫和多态喇叭虫的 ITS－1 区的核苷酸序列

Fig.1　Alignment of ITS－1 rDNA sequences of *T. shanghaiensis*, two strains of *T. thermophila* and outgroup *S. polymorphrus*

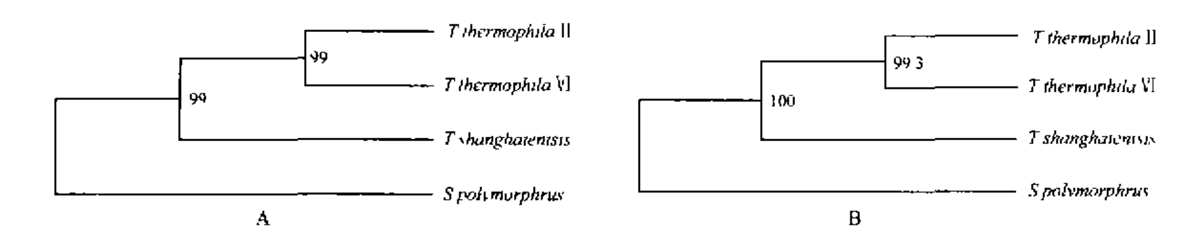


图 2　利用邻接法(A)和最大简约法(B)构建的 3 种四膜虫和多态喇叭虫的系统发育树

Fig.2　The phylogenetic trees of *T. shanghaiensis*, two strains of *T. thermophila* and outgroup *S. polymorphrus* using NJ (A) and maximum parimony (B) method inferred from small subunit ribosomal RNA sequences

各分支上的数值为经 100 次 bootstrap 后的置信度值(the number at the nodes represent the bootstrap percentages of 100)。

叭虫最近的位置,嗜热四膜虫Ⅱ和嗜热四膜虫Ⅵ聚为一个分类单元,远离外来群。说明上海四膜虫相对于另两种嗜热四膜虫来说可能较早地从祖先种中分化出来,较为原始。从三者间的遗传距离、ITS序列的变异度中都可看出上海四膜虫与两种嗜热四膜虫间有着明显的差异,而且比较两两间碱基的转换和颠换值可以发现,上海四膜虫与嗜热四膜虫Ⅱ和嗜热四膜虫Ⅵ都各有6次碱基的转换和颠换,而嗜热四膜虫Ⅱ和嗜热四膜虫Ⅵ间仅有2次转换,这不仅可理解为两者作为嗜热四膜虫种的不同株间的变异以转换为主,而且可认为这种与高等哺乳动物相同的变异方式(Clary & Wolstenholme, 1985)代表了进化中的一种进步趋势。

3.2 自接型四膜虫与接合型四膜虫间的进化关系

Elliott & Gruchy(1952)、Nanney(1953)认为一切自接型四膜虫都不能通过有性生殖过程产生健康后代,Elliott(1973)还认为,自接型四膜虫接合产生的后代不能存活这一特性是四膜虫种群排除不稳定的自接型的一种途径。而陈阅增等(1982)对上海四膜虫的自接细胞学过程的研究表明,该种自接型四膜虫的接合后体、大核系、亚大核系都能正常地生长繁殖,而且其后代仍能保持自接型特性,并初步推测自接型是四膜虫中一种较原始的生殖方式。高崇明等(2000)对上海四膜虫有小核细胞和无小核细胞间生殖过程的观察发现,在两者间也存在胞质配合的现象,并认为这种现象可能与自接型有关,进一步指出纤毛虫自接型比接合型可能更原始,进化地位更低。我们由ITS-1序列分析得出的上海四膜虫比两种嗜热四膜虫原始的结论,在从分子水平上为自接型较接合型进化地位低提供一定佐证的同时,也启发我们在丰富研究对象(增加其他自接型和接合型四膜虫种类)、扩大信息量(加上进化速率同样较快的ITS2区、寻找与四膜虫自接型和接合型有直接关系的基因)的基础上进行四膜虫自接型和接合型间进化关系,及自接型存在意义的研究,将不失为一条新的途径,而且也可以以此分析揭示上海四膜虫有小核、无小核间的系统发育问题和所涉及的细胞凋亡等问题。

致 谢 北京大学生命科学院高崇明副教授赠送四膜虫;复旦大学遗传所谢毅教授和吴海同志在测序工作中、中科院水生生物研究所周莉和吴波博士在实验过程中都给予了许多帮助,一并表示感谢。

参 考 文 献

Chen Y Z, Luo Z H, Cao T G, 1982. Conjugation in *Tetrahymena pyriformis* S1, a selfer strain from shanghai[J]. *Acta Zool. Sin.*, **28**(3):319-324.[陈阅增,罗泽华,曹同庚,1982.一个自配型梨形四膜虫的接合及其细胞学过程.动物学报,**28**(3):319-324.]

Benjamin K D, Robert D A, 1997. Intraspecific variation in *Cryptocaryon irritans*[J]. *J. Euk. Microbiol.*, **44**(1):25-32

Bernhard D D, Schlegel M, 1998. Evolution of histone H4 and H3 gene in different ciliate lineages[J]. *J. Mol. Evol.*, **46**(2):344-354.

Cech T R, 1986. RNA as an enzyme[J]. *Sci. Aamer.*, **255**(1):64-75.

Clary D O, Wolstenholme D R, 1985. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization and genetic code[J]. *J. Mol. Evol.*, **22**(2):252-271.

Elliott A M, 1973. Life cycle and distribution in Elliott[A]. Biology of *Tetrahymena*[M]. Dowen: Hutchinson and Ross.259.

Elliott A M, Gruchy D F, 1952. The occurrence of mating types in *Tetrahymena*[J]. *Biol. Bull.*, **103**(3):301-311.

Feng S L, Sun Q, Cao T G *et al*, 1988. The S1 strain of *Tetrahymena* from shanghai—*Tetrahymena shangha* sp. no[J] *Acta Zool. Sin.*, **34**(1):42-49.[冯荪莲,孙 群,曹同庚等,1988.四膜虫S1株——上海四膜虫,新种.动物学报,**34**(1):42-49.]

Gao C M, Li Y X, Yin Y *et al*, 2000. Cytogamy in *Tetrahymena shanghai*[J] *Acta Zool. Sin.*, **46**(3):346-352.[高崇明,李益勋,殷 莹等,2000.上海四膜虫的胞质配合.动物学报,**46**(3):346-352.]

Johnson A M, 1990. Phylogeny and evolution of Protozoa[J]. *Zoological Science*, **7**(Suppl.):179-188.

Li Y Z, Gao C M, Chen Y Z, 1996. Clonal aging in *Tetrahymena shangha* S1[J]. *Acta Zool. Sin.*, **42**(1):60-68.[李荫蓁,高崇明,陈阅增,1996.上海四膜虫S1的克隆老化.动物学报,**42**(1):60-68.]

Nanney D L, 1953. Nucleo-cytoplasmic inter action during conjugation in *Tetrahymena*[J]. *Biol. Bull.*, **105**(1):133-139.

Pleyte K A, Duncan S D, Phillips R D, 1992. Evolutionary relationships of the samonid fish genus *Salvelinus* inferred from DNA sequences of the first internal transcribed spacer (ITS-1) of rDNA[J]. *Mol. Phylogen. Evol.*, **1**(1):223-230.

Prearata R M, Meyer E B, Perarata F P *et al*, 1989. Ciliate evolution: the ribosomal phylogenies of the *Tetrahymenine ciliates*[J]. *J. Mol. Evol.*, **28**(4):427-441.

Schlotterer C, Hauser M, Hauseler A *et al*, 1994. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*[J]. *Mol. Biol. Evol.*, **11**(4):513-522.

Strüder-Kypke M C, Wright A D G, Fokin S I *et al*. 2000. Phylogenetic relationships of the subclass Peniculia (Oligohymenophorea, Ciliophora) inferred from small subunit rRNA gene sequences[J]. *J. Euk Microbio.*, **47**:419-429.

Zhang X Y, Sun C, Yan T T, 2000. RAPD analysis of genetic diversity of *Cachesium polypinum*[J]. *Chinese Biodiversity*, **8**(3):257-261.[张锡元,孙 翀,晏婷婷等,2000.蝎状独缩虫(*Cachesium polypinum*)遗传多样性的RAPD分析.生物多样性,**8**(3):257-261.]

动 物 学 研 究 2001, Aug. 22 (4): 269~274 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

TGF-β在小鼠胎盘中的表达

高 飞 马 捷 傅国强 魏 鹏 冯 强 刘以训[①]
(中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室 北京 100080)

摘要：利用原位杂交和免疫组化的方法对小鼠胎盘中的TGF-β (transform growth factor-β) mRNA和蛋白质进行检测，结果显示：在妊娠第7.5~9.5天，TGF-β主要在子宫蜕膜中表达，而且表达逐渐增强。说明这一时期TGF-β的作用主要是控制滋养层细胞的侵入，这种控制是通过对PA (plasminogenin activotor) 和MMP (matrix metalloproteinase) 两类主要的细胞外蛋白水解酶的抑制作用来实现的。到妊娠10.5天时，滋养层巨细胞明显表达TGF-β mRNA和蛋白质，这与其功能的转换是一致的。因为此时的滋养层巨细胞体积变大，停止增殖，其功能也从侵入型向内分泌型转换。海绵滋养层细胞从第9.5天开始表达TGF-β mRNA，而TGF-β抗原从第10.5天开始出现，第11.5~12.5天，TGF-β mRNA的表达达到最高，此时的TGF-β的作用是调控胎儿血管的形成。另外，TGF-β对免疫系统有强烈的抑制作用，妊娠中后期海绵滋养层细胞可能通过大量表达TGF-β以调节局部免疫，避免母体对胎儿的免疫排斥。

关键词：转化生长因子；小鼠；胎盘；滋养层细胞；海绵滋养层细胞；滋养层巨细胞
中图分类号：Q942 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853(2001)04-0269-06

转化生长因子-β (TGF-β) 是一种多功能的 细胞因子，与细胞的生长、分化和免疫调节有着密

收稿日期：2001-01-16；修改稿收到日期：2001-03-07
基金项目：WHO/洛氏基金联合研究项目、"973"、"攀登"和"创新工程"项目
①联系人，电话：010-62588461，传真：010-62588461，E-mail：liuyx@panda.ioz.ac.cn

(上接第268页)

Phylogenetic Relationships among *Tetrahymena shanghaienisis* and two Strains of *Tetrahymena thermophila* Inferred from ITS-1 Sequences

MIAO Wei YU Yu-He SHEN Yun-Fen
(*Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan* 430072, *China*)

Abstract: Phylogenetic relationships among three strains of *Tetrahymena* (i.e. *T. shanghaienisis*, *T. thermophila* Ⅱ and *T. thermophila* Ⅵ) were investigated using sequences of the first internal transcribed spacer region (ITS-1) of ribosomal DNA (rDNA). Amplified rDNA sequences consisted of 221 bases of the flanking 18*S* and 5.8*S* regions, and the entire ITS-1 region (169 or 172 bases). There were 5 variable bases among three strains in the 18*S* region and 16 variable bases in the ITS-1 region. The affiliation of them were assessed using both Neighbor-joining (NJ) and maximum parsimony (MP) analyses. Variations do exist in the phylogenies created by the two methods. However, the basic tree topologies are consistent. In both the NJ and MP analyses, *T. shanghaienisis* diverge from the ancestor of *Tetrahymena* earlier than *T. thermophila* Ⅱ and *T. thermophila* Ⅵ, which show that the selfer might be primitive.

Key words: *Tetrahymena*; Phylogenetic relationships; ITS-1 region; Selfer; Mating type